

2/9/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI

(c) 2002 Thomson Derwent. All rts. reserv.

003892660

WPI Acc No: 1984-038201/ 198407

XRAM Acc No: C84-016015

Determn. of enzyme, inhibitor, activator and zymogen activity - by reacting the enzyme with hydrolysable naphthalene derivs. which is then allowed to form pigment with fast red-ITR-salt

Patent Assignee: TORII & CO LTD (TORI)

Inventor: FUJII S; SAWAI S; SUGIYAMA S

Number of Countries: 005 Number of Patents: 008

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 3327873	A	19840209	DE 3327873	A	19830802	198407 B
FR 2531453	A	19840210	FR 8312710	A	19830802	198411
JP 59025699	A	19840209	JP 82135534	A	19820803	198412
GB 2126720	A	19840328	GB 8320832	A	19830802	198413
GB 2126720	B	19850829				198535
DE 3327873	C	19861023				198643
US 4772553	A	19880920	US 86875161	A	19860617	198840
JP 90036239	B	19900816	JP 82135534	A	19820803	199037

Priority Applications (No Type Date): JP 82135534 A 19820803

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
DE 3327873	A		42		

Abstract (Basic): GB 2126720 A

A method of measuring the activity of an enzyme, an enzyme inhibitor, an enzyme activator, or a zymogen, which comprises reacting the enzyme with a compound of the general formula (I) in which R1 represents an amino acid or an oligopeptide, the C-terminal group of which is bonded via an ester linkage to the naphthyloxy moiety; and R2 represents a hydrogen atom or a halogen atom, to form a compound of the general formula (II) in which R2 is as defined above, reacting the product with an N-substituted- or N,N'-disubstituted-4-methoxymetanilamide diazonium salt to form an azo dye, and determining the azo dye.

DE 3327873 A

The process comprises (a) reacting an enzyme with a substrate of formula (I) so that the substrate is hydrolysed and then (b) reacting the hydrolysis prod. of formula (II) with Fast Red-ITR-salt (N,N'-diethyl-4-methoxymetanilamide diazonium salt) (III) so that a pigment is formed, and then determining the pigment (where R1 is an amino acid or an oligopeptide which are bonded in the form of their esters via their C terminal COOH gps.; R2 is H or Br).

The process can be used in quality control of enzyme preps., in clinical investigations and in the diagnoses of various illnesses which depend on the enzyme content of blood or urine. This process is not adversely influenced by the presence of nitrite ions. The reaction between enzyme and substrate can be stopped by acidification and the reaction mixt. then used directly for the colour reaction. Both reaction steps can be carried out at the same temp.

0/0

Abstract (Equivalent): GB 2126720 B

A method of measuring the activity of an enzyme, an enzyme inhibitor, an enzyme activator, or a zymogen, which comprises reacting the enzyme with a compound of the general formula (I) in which R1 represents an amino acid or an oligopeptide, the C-terminal group of which is bonded via an ester linkage to the naphthyloxy moiety; and R2 represents a hydrogen atom or a halogen atom, to form a compound of the general formula (II) in which R2 is as defined above, reacting the product with an N-substituted- or N,N'-disubstituted-4-methoxymetanilamide diazonium salt to form an azo dye, and determining the azo dye.

Abstract (Equivalent): US 4772553 A

Enzyme is assayed by (a) allowing it to react with a substrate of formula (I); (b) allowing corresp. hydrolysis prod. to react with a FR-ITR salt (Fast Red-ITR salt (N,N'-diethyl -methoxymetonilamide diazonium salt)) to form a pigment; then (c) determining the pigment.

R1 is an amino acid or oligopeptide combined as its ester form through the C-terminal; and R2 is H or Br.

Pref. R3 is A-R3-R4-R5-R6-CO-, where A is H, acyl, or sulphonyl; R3-5 are each Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Gln, Glu, pyro Glu, or a single bond; and R6 is Lys, Lys(Me), Arg, Met, or Tyr.

USE - In determination of serine protease, e.g. trypsin, chymotrypsin, kallikrein, plasmin, etc.

(16pp)

Title Terms: DETERMINE; ENZYME; INHIBIT; ACTIVATE; ZYMOGEN; ACTIVE; REACT; ENZYME; HYDROLYSIS; NAPHTHALENE; DERIVATIVE; ALLOW; FORM; PIGMENT; FAST; RED; SALT

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Additional): C07C-101/02; C07C-103/52;

C12M-001/34; C12N-001/34; C12N-009/99; C12Q-001/34

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02C; B04-B04B; B04-B04D; B04-B04F; B04-C01;

B04-C02; B07-D03; B10-A08; B10-A16; B10-A17; B10-D03; B11-C07B; B12-K04; D05-A02

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M750 M903 N102 P831 Q233 V802 V803 V804 V805 V810 V814 V815

02 M423 M760 M903 N102 P831 Q233 V615 V632

Chemical Fragment Codes (M2):

03 C316 F011 F012 F015 F423 G010 G013 G017 G020 G021 G029 G111 G112
G221 H100 H101 H102 H181 H182 H211 H401 H441 H598 H603 H641 J0 J011
J012 J013 J014 J2 J211 J241 J371 J372 J373 J521 K353 L250 L941 M210
M211 M240 M262 M271 M273 M280 M281 M311 M312 M313 M314 M321 M331
M333 M340 M342 M343 M349 M381 M391 M413 M414 M430 M510 M520 M521
M531 M532 M540 M782 M903 P831 Q233 V902 V911 V921 V924 V925

04 C316 G015 G100 H5 H541 H8 K0 K3 K353 K5 K533 M210 M211 M212 M272
M273 M281 M282 M320 M414 M430 M510 M520 M531 M540 M782 M903 P831
Q233 Q505

Chemical Fragment Codes (M6):

05 M903 Q233 Q505 R309 R514 R611 R612 R623 R627 R632

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

Offenlegungsschrift
DE 33 27 873 A 1

Int. Cl. 3:
C 12 Q 1/34
C 12 Q 1/38



DEUTSCHES
PATENTAMT

Aktenzeichen: P 33 27 873.3
Anmeldetag: 2. 8. 83
Offenlegungstag: 9. 2. 84

DE 33 27 873 A 1

Unionspriorität: 32 33 31
03.08.82 JP P135534-82

Anmelder:
Torii & Co., Ltd., Tokyo, JP

Vertreter:
Reitstötter, J.,
Prof.Dipl.-Ing.-Chem.Dr.phil.Dr.techn.; Kinzebach,
W., Dipl.-Chem. Dr.phil., Pat.-Anw., 8000 München

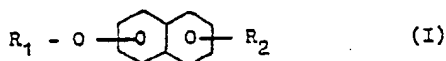
Erfinder:
Fujii, Setsuro, Toyonaka, JP; Sugiyama, Satoshi;
Sawai, Syouzou, Chiba, JP

Behördeneigentum

Erfindungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen, Enzyminhibitoren, Enzymaktivatoren oder Zymogenen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man ein Enzym mit einem Substrat der allgemeinen Formel I



worin R_1 eine Aminosäure oder ein Oligopeptid, welche über ihre C-terminale Carboxylgruppe in Form eines Esters gebunden sind, und R_2 ein Wasserstoff- oder Bromatom bedeuten, reagieren läßt, wobei das Substrat hydrolysiert wird, anschließend das Hydrolyseprodukt der allgemeinen Formel



worin R_2 die oben angegebenen Bedeutungen besitzt, mit FR-ITR-Salz (Fast Red-ITR-Salz (N,N'-Diethyl-4-methoxy-metanilamid-diazoniumsalz)) unter Bildung eines Pigments reagieren läßt und das Pigment bestimmt. (33 27 873)

00-08-83

3327873

M/24 172

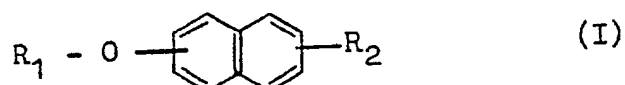
1

5

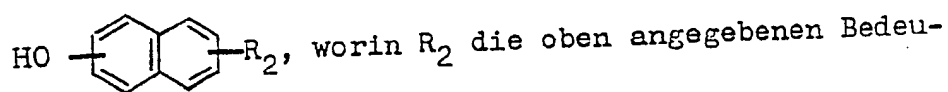
10

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen, Enzyminhibitoren, Enzymaktivatoren oder Zymogenen, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Enzym mit einem Substrat der allgemeinen Formel I

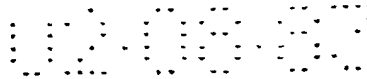


- 20 worin R_1 eine Aminosäure oder ein Oligopeptid, welche über ihre C-terminale Carboxylgruppe in Form eines Esters gebunden sind, und R_2 ein Wasserstoff- oder Bromatom bedeuten, reagieren läßt, wobei das Substrat hydrolysiert wird, anschließend
- 25 das Hydrolyseprodukt der allgemeinen Formel



- 30 tungen besitzt, mit FR-ITR-Salz [Fast Red-ITR-Salz (N,N'-Diethyl-4-methoxymetanilamid-diazoniumsalz)] unter Bildung eines Pigments reagieren läßt und das Pigment bestimmt.

35



3327873

M/24 172

2

1

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin R_1 für
5 A- R_3 - R_4 - R_5 - R_6 -CO- steht, wobei A ein Wasserstoffatom
oder eine Acyl- oder Sulfonylgruppe bedeutet, R_3 , R_4
und R_5 jeweils Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe,
Gln, Glu, pyroGlu oder eine Einfachbindung bedeuten
und R_6 für Lys, Lys(Me), Arg, Met oder Tyr steht.

10

3. Verfahren nach Anspruch 2, worin A
ein Wasserstoffatom oder Ac, Bz, Tos, Boc, Cbz, Dansyl
oder Glt bedeutet.

15 4. Verfahren nach Anspruch 3, worin R_1 für
A-Tyr-, A-Arg-, A-Lys-, A-Gly-Lys-, A-Phe-Arg-,
A-Gly-Gly-Arg-, A-Leu-Gly-Arg-, A-Gln-Gly-Arg-,
A-pyroGlu-Gly-Arg-, A-Leu-Ala-Arg-, A-Pro-Phe-Arg-,
A-D-Val-Leu-Lys-, A-Phe-Val-Arg- oder A-Ile-Glu-
20 Gly-Arg- steht.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, da-
durch gekennzeichnet, daß man als Substrat der Formel
(I) Tos-Lys- α -NE, Ac-Tyr- α -NE, Bz-Leu-Ala-Arg- α -NE,
25 Ac-Phe-Arg- α -NE, H-Pro-Phe-Arg- α -NE oder Ac-Gly-Lys-
 α -NE verwendet.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, da-
durch gekennzeichnet, daß man als Enzym die Serin-
30 protease E.C. 3.4.21 verwendet.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, da-
durch gekennzeichnet, daß man als Enzym Trypsin, Chymo-
trypsin, Kallikrein, Plasmin, Thrombin, Urokinase, Fak-
35 tor Xa, C1 \bar{S} oder C1 \bar{r} und als Inhibitor, Aktivator oder
Zymogen Antithrombin III, Heparin, Antiplasmin, Pre-
kallikrein oder Plasminogen verwendet.

02.08.83

3327873

3

M/24 172

1

8. .Verwendung der Verbindungen der Formel I nach den
Ansprüchen 1 - 5 zur Bestimmung der Aktivität von
Enzymen, Enzyminhibitoren, Enzymaktivatoren oder
Zymogenen.

5

10

15

20

25

30

35

3327873

PROF. DR. DR. J. REITSTÖTTER DR. WERNER KINZEBACH
DR. ING. WOLFRAM BÜNTE (1958-1976)

4.

REITSTÖTTER, KINZEBACH & PARTNER
POSTFACH 780, D-8000 MÜNCHEN 43

PATENTANWÄLTE
ZUGELASSENE VERTRETER BEIM
EUROPÄISCHEN PATENTAMT
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS

TELEFON: (089) 2 71 65 83
TELEX: 05215208 ISAR D
BAUERSTRASSE 22, D-8000 MÜNCHEN 40

München, 2. August 1983

UNSERE AKTE: M/24 172
OUR REF:

BEZUG:

Torii & Co., Ltd.
3, Nihonbashi-Honcho-3-chome
Huo-ku
Tokyo / Japan

Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen

00.08.83

3327873

M/24 172

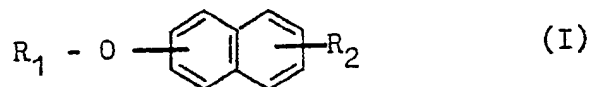
x

. 5.

1

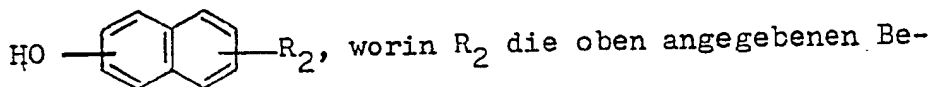
Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung
5 der Aktivität von Enzymen, Enzyminhibitoren, Enzym-
aktivatoren oder Zymogenen, das dadurch gekennzeichnet
ist, daß man ein Enzym mit einem Substrat der allge-
meinen Formel I

10



worin R_1 eine Aminosäure oder ein Oligopeptid, welche
über ihre C-terminale Carboxylgruppe in Form eines
15 Esters gebunden sind, und R_2
ein Wasserstoff- oder Bromatom bedeuten, reagieren
läßt, wobei das Substrat hydrolysiert wird, anschließen
das Hydrolyseprodukt der allgemeinen Formel

20



deutungen besitzt, mit FR-ITR-Salz [Fast Red-ITR-Salz
(N,N'-Diethyl-4-methoxymetanilamid-diazoniumsalz)]
unter Bildung eines Farbstoffs reagieren läßt und das
Farbstoff bestimmt.

25

Bei den oben erwähnten Enzymen handelt es sich um
Enzyme, die die Verbindungen der Formel (I) zu hydro-
lysieren vermögen. Zu derartigen Enzymen zählen
Serinproteasen, wie Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein,
30 Plasmin, Thrombin, Urokinase, Faktor Xa, C1S und
C1F, weitere Proteasen und Esterasen sowie unbekannte
Enzyme, die in der Lage sind, die Verbindungen der

35

M/24 172

2

1

. 6 .

- Formel (I) zu hydrolysieren. Ein Beispiel für die
5 Bestimmung unbekannter Enzyme anhand des erfindungs-
gemäßen Verfahrens ist die elektrophoretische Be-
stimmung der Enzymverteilung im Blut oder Urin und
die Zellfärbung.
- 10 Das erfindungsgemäße Verfahren ist brauchbar für die
Bestimmung der Serinprotease E.C.
3.4.21 neben weiteren Enzymen. Das erfindungsgemäße
Verfahren ist insbesondere für die Bestimmung von
Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein, Plasmin, Thrombin,
15 Urokinase, Faktor Xa, C1 \bar{S} und C1 \bar{F} geeignet. Es ist
auch möglich, das erfindungsgemäße Verfahren für die
Bestimmung von Inhibitoren, Aktivatoren und Zymogenen
der oben erwähnten Enzyme, wie beispielsweise Anti-
thrombin III, Heparin, α_2 -Plasmin-Inhibitor, α_1 -
20 Trypsin-Inhibitor, Streptokinase, Echis carinatus
venom (ECV), Prekallikrein, Plasminogen und Pro-
thrombin, zu verwenden.

- In der Formel (I) bedeutet R₁ eine Aminosäure oder
25 ein Oligopeptid, welche über ihre C-terminale
Carboxylgruppe an das Sauerstoffatom gebunden sind
und auf diese Weise einen Ester bilden. Der Ausdruck
"Aminosäure oder Oligopeptid" bedeutet eine Amino-
säure oder ein Oligopeptid mit 2 bis 4 Aminosäuren,
30 die gleich oder verschieden sein können, wobei der
N-Terminus frei ist oder eine Acyl- oder Sulfonyl-
gruppe aufweist. Beispiele für Aminosäuren sind
die L-, D- und DL-Formen von Gly, Ala, Val, Leu,
Ile, Met, Pro, Phe, Gln, Glu, pyroGlu, Lys, Lys(Me),
35 Arg und Tyr.

M/24.172

3

1

. 7 .

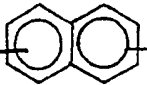
Beispiele geeigneter Substrate der Formel (I) sind
 5 diejenigen, in denen R_1 für $A-R_3-R_4-R_5-R_6-CO-$ steht,
 wobei A ein Wasserstoffatom oder eine Acyl- oder
 Sulfonylgruppe bedeutet, R_3 bis R_5 jeweils Gly, Ala,
 Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Gln, Glu, pyroGlu oder
 eine Einfachbindung bedeuten und R_6 für Lys, Lys(Me),
 10 Arg, Met oder Tyr steht. Vorzugsweise steht A für
 ein Wasserstoffatom, Ac, Bz, Tos, Boc, Cbz, Dansyl
 oder Glt. Bevorzugte Substrate sind diejenigen, in
 denen R_1 für A-Tyr-, A-Arg-, A-Lys-, A-Gly-Lys-,
 A-Phe-Arg-, A-Gly-Gly-Arg-, A-Leu-Gly-Arg-,
 15 A-Gln-Gly-Arg-, A-pyroGlu-Gly-Arg-, A-Leu-Ala-Arg-,
 A-Pro-Phe-Arg-, A-Val-Leu-Lys-, A-Phe-Val-Arg- oder
 A-Ile-Glu-Gly-Arg- steht. Die bevorzugtesten Sub-
 strate der Formel (I) sind Tos-Lys- α -NE, Ac-Tyr- α -NE,
 Bz-Leu-Ala-Arg- α -NE, Ac-Phe-Arg- α -NE, H-Pro-Phe-
 20 Arg- α -NE und Ac-Gly-Lys- α -NE.

In der Formel (I) bedeutet R_2 ein Wasserstoff- oder
 Bromatom. Beispielsweise kann es sich um Bromderivate
 handeln, in denen das Bromatom in 6-Stellung steht.

25

Bei den Verbindungen der Formel (I) handelt es sich
 also um Verbindungen, in denen der C-Terminus der
 oben erwähnten Aminosäuren oder Oligopeptide mit
 den Verbindungen der Formel

30

HO —  — R_2 einen Ester bildet.

35

000000

3327873

M/24 172

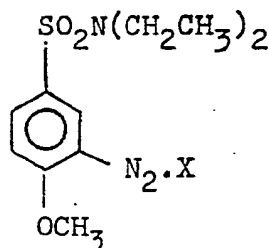
4

1

.8.

Obwohl für die Reaktion zwischen dem Enzym und dem Substrat die Zeit und die Temperatur dieser Reaktion von der Reaktivität und den Mengen beider Reaktanten abhängen, beträgt die Reaktionszeit im allgemeinen 2 Stunden oder weniger, vorzugsweise 30 Sekunden bis 90 Minuten. Die Reaktionstemperatur liegt im allgemeinen bei 20 bis 40°C, vorzugsweise bei 20 bis 37°C. Das FR-ITR-Salz [Fast Red-ITR-Salz (N,N'-Diethyl-4-methoxymetanilamid-diazoniumsalz)] hat die Formel

15




20

worin X ein Halogenatom bedeutet, und liegt vorzugsweise in Form des Additionsproduktes mit 1/2 ZnCl₂ vor.

25

Das Pigment, das durch die Reaktion des FR-ITR-Salzes

mit einer Verbindung der Formel HO--R₂,

30

welche durch die Hydrolyse des Substrats [Formel (I)] mittels eines Enzyms gebildet wird, entsteht, ist ein Azofarbstoff. Die Reaktionszeit für diese Farbreaktion beträgt 2 Stunden oder weniger, vorzugsweise 30 Sekunden bis 90 Minuten. Die Reaktion zwischen einem Substrat und einem Enzym und die Farbreaktion unter Verwendung des FR-ITR-Salzes können nachein-

35

000000

3327873

M/24 172

8

1

. 9 .

ander oder gleichzeitig durchgeführt werden. Die ge-
 bildete Pigmentmenge wird spektroskopisch unter
 Verwendung eines Colorimeters oder Spektrophotometers
 oder visuell bestimmt. Die der spektroskopischen Be-
 stimmung zugrundeliegende Wellenlänge beträgt in den
 meisten Fällen 450 bis 550 nm. Die visuelle Methode
 erfolgt anhand eines Vergleichs mit einem Standard
 und wird bei der elektrophoretischen Bestimmung von
 Enzymverteilungen oder bei der Zellfärbung verwendet.

Die Bestimmung der Enzymaktivität ist für die Quali-
 tätskontrolle von Enzympräparaten, bei klinischen
 Untersuchungen und bei der Diagnose verschiedener
 Krankheiten, die auf der Untersuchung des Enzymge-
 halts von Blut oder Urin beruht, von Bedeutung.

Es sind verschiedene Verfahren für die Bestimmung
 der Enzymaktivität bekannt. Am häufigsten kommt ein
 Verfahren unter Verwendung eines synthetischen Sub-
 strats zur Anwendung, wobei ein Naphtholester einer
 Aminosäure oder eines Peptids als ausgezeichnetes
 Substrat bekannt ist (JA-OSen 63 049/79 und
 59 151/80; im folgenden wird das in diesen Patent-
 anmeldungen beschriebene Verfahren als "Verfahren
 des Stands der Technik" bezeichnet). Gemäß dem
 Verfahren des Stands der Technik, in dem die Enzym-
 aktivität unter Verwendung eines derartigen Naphthol-
 esters bestimmt wird, läßt man das Naphthol, das
 durch die Hydrolyse mit einem Enzym freigesetzt
 wird, mit FVB-Salz [Fast Violet B-Salz (6-Benz-
 amido-4-methoxy-m-toluidin-diazoniumsalz)] reagieren,

35

M/24 172

8

1

. 10 .

wobei man ein Azopigment erhält, das anschließend be-
stimmt wird. Gemäß dem Verfahren des Stands der Tech-
nik wird die Reaktion zwischen dem freigesetzten
Naphthol und dem FVB-Salz unter Kühlen in Eis-Wasser
durchgeführt, weil ansonsten eine Hydrolyse des Diazo-
niumsalzes oder eine Reaktion des Diazoniumsalzes
mit sich selbst erfolgt, was in schwankenden Ab-
sorptions- oder λ_{\max} -Werten resultiert.

Erfindungsgemäß erfolgt dagegen, wie in Beispiel 1
beschrieben, die Reaktion der freigesetzten Verbindung

15

der Formel $\text{HO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{R}_2$ mit dem FR-ITR-Salz in

einem Temperaturbereich von 0 bis 40°C ohne Schwankung
der beobachteten Absorptions- oder λ_{\max} -Werte. Gemäß
dem Verfahren des Stands der Technik muß die Reak-
tionszeit für die Reaktion zwischen dem freigesetzten
Naphthol und dem FVB-Salz genauestens kontrolliert
werden, weil die Absorption in Abhängigkeit von der
Reaktionszeit variiert. Erfindungsgemäß ist dagegen
die Reaktion der freigesetzten Verbindung der Formel

25

$\text{HO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{R}_2$ mit dem FR-ITR-Salz rasch beendet,

wobei sich die Absorption selbst nach beendeter Re-
aktion nicht ändert.

30

Gemäß dem Verfahren des Stands der Technik ist es, wie
oben ausgeführt, erforderlich, die Temperatur für
die Reaktion zwischen Enzym und Substrat (im allge-

35

M/24 172

1

7
M.

meinen 20 bis 40°C) auf die Temperatur für die Farb-
reaktion (ungefähr 0°C) einzustellen und darüber hin-
aus die Absorption innerhalb einer vorgeschriebenen
Zeitspanne zu bestimmen. Ein wesentlicher Vorteil des
erfindungsgemäßen Verfahrens liegt deshalb darin,
daß es nicht mehr länger erforderlich ist, die beiden
Verfahrensschritte bei unterschiedlichen Temperaturen
und die Farbreaktion innerhalb eines gewissen Zeit-
limits durchzuführen. Dies ist insbesondere deswegen
von Bedeutung, weil das erfindungsgemäße Verfahren
eine Vereinfachung des Assays und insbesondere die
Durchführung des Assays mit Hilfe eines Autoanalyzers,
bei dessen Verwendung es schwierig ist, die Verfah-
renstemperatur zu wechseln, ermöglicht.

Ein weiterer Nachteil des Verfahrens des Stands der
Technik ist das bei der Bestimmung der Enzymaktivi-
tät im Urin häufig auftretende Schwanken der beob-
achteten Werte. Es konnte gezeigt werden, daß dieses
Schwanken durch die Anwesenheit von Nitritionen, die
bei Kontaminierung des Urins mit einem Mikroorganis-
mus unvermeidlich ist, verursacht wird. Die Anwesen-
heit von Nitritionen im Urin, die unabhängig von
den Enzymen im Urin ist, stand der Anwendung des
Verfahrens des Stands der Technik bei der Bestimmung
von Enzymen im Urin entgegen [Nippon Rinsho (Japan
Clinic), Band 37, Special number for the summer,
2668 (1979)]. Im Gegensatz dazu besitzt das erfin-
dungsgemäße Verfahren den Vorteil, daß es, wie in
Beispiel 2 beschrieben, durch die Anwesenheit von
Nitritionen nicht nachteilig beeinflusst wird.

35



3327873

M/24 172

8

1

. 12 .

Bei der praktischen Anwendung ist es häufig erforderlich, die Reaktion zwischen Enzym und Substrat vor der Farbreaktion durch Ansäuern der Reaktionsmischung zu beenden. Gemäß dem Verfahren des Stands der Technik unter Verwendung des FVB-Salzes läuft die Farbreaktion im sauren Bereich (pH 1 bis 4) jedoch nicht ab, wohingegen beim erfindungsgemäßen Verfahren die Farbbildung auch in diesem pH-Bereich erfolgt. Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht deshalb darin, daß nach Beendigung der Reaktion zwischen Enzym und Substrat durch Ansäuern die Reaktionsmischung direkt für die Farbreaktion eingesetzt werden kann.

Es ist ersichtlich, daß die Verwendung des FR-ITR-Salzes als Färbemittel in einem vorteilhaften Verfahren zur Bestimmung der Enzymaktivität resultiert.

Nachfolgend sind die in der Beschreibung und den Ansprüchen verwendeten Abkürzungen erläutert.

25

30

35

00-00-00

3327873

M/24 172

13.

1

Gly Glycyl $\text{-HN-CH}_2\text{-CO-}$

5

Ala Alanyl $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{-HN-CH-CO-} \end{array}$

10

Val Valyl $\begin{array}{c} \text{CH(CH}_3)_2 \\ | \\ \text{-HN-CH-CO-} \end{array}$

Leu Leucyl $\begin{array}{c} \text{CH(CH}_3)_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{-NH-CH-CO-} \end{array}$

15

Ile Isoleucyl $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH(CH}_3) \\ | \\ \text{-NH-CH-CO-} \end{array}$

20

Met Methionyl $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{S} \\ | \\ (\text{CH}_2)_2 \\ | \\ \text{-NH-CH-CO-} \end{array}$

25

30

Pro Prolyl $\begin{array}{c} \text{CO-} \\ | \\ \text{N} \\ | \end{array}$

35

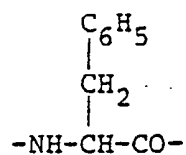
000000

3327873

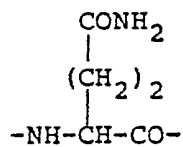
M/24 172

16.

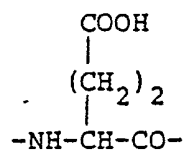
Phe Phenylalanyl



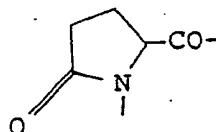
Gln Glutaminyl



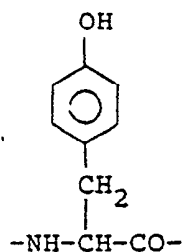
Glu Glutamyl



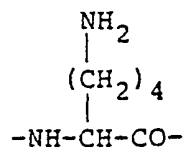
pyroGlu Pyroglutamyl



Tyr Tyrosyl



Lys Lysyl



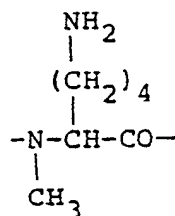
02-08-83

3327873

15.

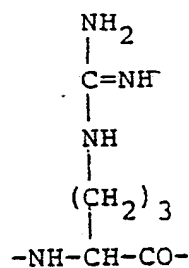
M/24 172

Lys (Me)

 α -N-Methyllysyl

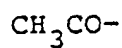
Arg

Arginyl



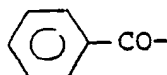
Ac

Acetyl



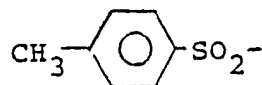
Bz

Benzoyl



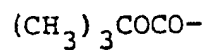
Tos

p-Toluolsulfonyl



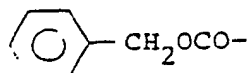
Boc

tert-Butoxy-carbonyl



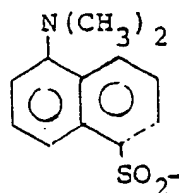
Cbz

Benzyloxycarbonyl



Dansyl

Dansyl



00-00-00

3327873

M/24 172

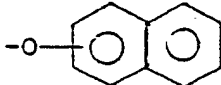
12. 16.

1

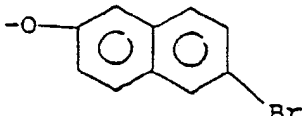
Glt Glutaryl $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_3-\text{CO}-$

5

Me Methyl CH_3-

NE Naphthyl-ester 

10

6-Br-β-NE 6-Brom.-β-naphthyl-ester 

15

DMSO Dimethyl-sulfoxid

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert. Wenn nicht anders angegeben, werden die zur Anwendung kommenden Aminosäuren in der L-Form eingesetzt.

Beispiel 1

Einfluß der Reaktionstemperatur und -zeit auf die Bestimmung der Kallikrein-Aktivität im Urin unter Verwendung von H-Pro-Phe-Arg-α-NE als Substrat und FR-ITR-Salz oder FVB-Salz als Färbemittel:

Zu 1,0 ml eines 50 mM Natriumphosphatpuffers (pH 7,0), der 0,015% Natriumdodecylsulfat (SDS) enthält, gibt man 0,1 ml Urin und 0,1 ml einer 1,5 mM wäßrigen Lösung von H-Pro-Phe-Arg-α-NE. Die Mischung wird 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,1 ml einer 1%igen wäßrigen FR-ITR-Salz-Lösung oder einer 1%igen

35

M/24 172

18

.17.

1

- 5 wäßrigen FVB-Salz-Lösung läßt man die Mischung unter
den folgenden Temperatur-Zeit-Bedingungen reagieren:
0°C - 10 min, 25°C - 10 min, 25°C - 30 min, 37°C -
10 min und 37°C - 30 min. Danach vermischt man jede
Reaktionsmischung mit 1,0 ml Eisessig und bestimmt
die Absorption. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1
10 zusammengestellt.

Tabelle 1

<u>Reaktionsbedingungen</u>		<u>FVB-Salz</u>	<u>FT-ITR-Salz</u>
Temp., °C	Zeit, min	Absorption (λ_{\max} , nm)	Absorption (λ_{\max} , nm)
15	0	0,620 (500)	0,620 (477)
	25	0,153 (510)	0,628 (")
		0,207 (510)	0,625 (")
	37	0,227 (513)	0,625 (")
		0,334 (513)	0,621 (")
	30		

20

- Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß bei Verwendung
des FVB-Salzes sowohl die Absorption als auch der
 λ_{\max} -Wert von der Reaktionstemperatur und der Reak-
tionszeit beeinflußt werden. Bei Verwendung des FR-
25 ITR-Salzes dagegen erfolgt im wesentlichen keine
Änderung der Absorption oder des λ_{\max} -Wertes, d.h.
die beiden Werte bleiben praktisch konstant.

Beispiel 2

- 30 Einfluß von Natriumnitrit auf die Bestimmung der
Kallikrein-Aktivität im Urin unter Verwendung von
H-Pro-Phe-Arg- α -NE als Substrat und FR-ITR-Salz
oder FVB-Salz als Färbemittel:

35



3327873

M/24 172

14

-18-

1

Zu 1,0 ml eines 50 mM Natriumphosphatpuffers (pH 7,0),
5 der 0,015% SDS enthält, gibt man 0,1 ml Urin, der
Natriumnitrit in einer Konzentration von 0, 1, 2,
3, 4 oder 5 mM enthält, und 0,1 ml einer 1,5 mM
wäßrigen H-Pro-Phe-Arg- α -NE-Lösung. Jede Mischung
wird 30 min bei 37°C inkubiert. Für den Versuch un-
10 ter Verwendung von FR-ITR-Salz gibt man dazu 0,1 ml
einer 1%igen wäßrigen FR-ITR-Salz-Lösung und läßt die
erhaltene Mischung 5 min bei 37°C reagieren. Nach
Zugabe von 1,0 ml Eisessig bestimmt man die Absorp-
tion der Reaktionsmischung bei 475 nm. Für den Ver-
15 such unter Verwendung des FVB-Salzes gibt man zu der
oben erwähnten Reaktionsmischung 0,1 ml einer 1%igen
wäßrigen FVB-Salz-Lösung und läßt die Mischung 10 min
bei 0°C reagieren. Nach Zugabe von 1,0 ml Eisessig
bestimmt man die Absorption der Reaktionsmischung bei
20 505 nm.

Die Ergebnisse sind in Fig. 1 dargestellt, wobei auf
der Ordinate die Absorption und auf der Abszisse die
Konzentration an Natriumnitrit aufgetragen sind; die
25 mit "•" markierten Koordinaten betreffen den Versuch
unter Verwendung des FR-ITR-Salzes gemäß der Erfin-
dung, während die mit "o" markierten den Versuch un-
ter Verwendung des FVB-Salzes betreffen. Es ist er-
sichtlich, daß bei Verwendung des FVB-Salzes als
30 Färbemittel die Absorption durch die Anwesenheit von
Natriumnitrit stark beeinflußt wird, wohingegen bei
Verwendung des FR-ITR-Salzes gemäß der Erfindung die
Absorption praktisch konstant ist und damit durch
die Anwesenheit von Natriumnitrit nicht beeinflußt
35 wird.

02.08.83

3327873

M/24 172

15

- 19 -

1

Beispiel 3

- 5 Verfahren zur Bestimmung von Thrombin unter Verwendung von Tos-Lys- α -NE:

10 Zu 1,7 ml eines 50 mM Natriumphosphatpuffers (pH 7,0) gibt man 0,1 ml einer Lösung von Thrombin (1, 2 oder 3 NIH-E/ml) in physiologischer Kochsalzlösung und 0,2 ml einer 1 mM wäßrigen Tos-Lys- α -NE-Lösung. Jede Mischung wird 10 min bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml einer 1%igen wäßrigen FR-ITR-Salzlösung läßt man die Mischung 5 min bei 25°C reagieren. Die Reaktionsmischung vermischt man mit 2,0 ml 15 50%iger Essigsäure und bestimmt die Absorption bei 475 nm. Die Ergebnisse sind in Fig. 2 dargestellt, wobei auf der Ordinate die Absorption und auf der Abszisse die Thrombinmenge aufgetragen sind.

20

Beispiel 4

Verfahren zur Bestimmung von Trypsin unter Verwendung von Tos-Lys- α -NE:

- 25 Zu 1,7 ml eines 50 mM Natriumphosphatpuffers (pH 7,0) gibt man 0,1 ml einer Lösung von Trypsin (0,25, 0,5 oder 0,75 μ g/ml) in physiologischer Kochsalzlösung und 0,2 ml einer 1 mM wäßrigen Tos-Lys- α -NE-Lösung. Jede Mischung wird 15 min bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml einer 1%igen wäßrigen FR-ITR-Salzlösung läßt man die Mischung 5 min bei 25°C reagieren. Die Reaktionsmischung vermischt man dann mit 30 2,0 ml 50%iger Essigsäure und bestimmt die Absorption bei 475 nm. Die Ergebnisse sind in Fig. 3 dargestellt,

35

000000

3327873

M/24 172

18

- 20 -

1

5 wobei auf der Ordinate die Absorption und auf der Abszisse die Trypsinmenge aufgetragen sind.

B e i s p i e l 5

Verfahren zur Bestimmung von Urokinase unter Verwendung von Ac-Gly-Lys- α -NE:

10

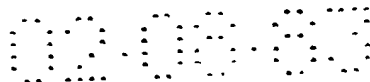
15 Zu 1,7 ml eines 50 mM Natriumphosphatpuffers (pH 7,0) gibt man 0,1 ml einer Lösung von Urokinase (60, 120, 180, 240 oder 300 IE/ml) in physiologischer Kochsalzlösung und 0,2 ml einer 1 mM wäßrigen Ac-Gly-Lys- α -NE-Lösung. Jede Mischung wird 15 min bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml einer 1%igen wäßrigen FR-ITR-Salz-Lösung läßt man die Mischung 5 min bei 25°C reagieren. Die Reaktionsmischung vermischt man dann mit 2,0 ml 50%iger Essigsäure und
20 bestimmt die Absorption bei 475 nm. Die Ergebnisse sind in Fig. 4 dargestellt, wobei auf der Ordinate die Absorption und auf der Abszisse die Urokinasemenge aufgetragen sind.

25 B e i s p i e l 6

Verfahren zur Bestimmung von Plasmin unter Verwendung von H-D-Val-Leu-Lys- α -NE:

30 Zu 1,7 ml eines 50 mM Natriumphosphatpuffers (pH 7,0) gibt man 0,1 ml einer Lösung von Plasmin (0,125, 0,25, 0,375, 0,5 oder 0,625 CU /ml) in physiologischer Kochsalzlösung und 0,2 ml einer 10%igen wäßrigen DMSO-Lösung, die 1 mM H-D-Val-Leu-Lys- α -NE enthält. Jede Mischung wird 15 min bei 25°C inku-

35



3327873

M/24 172

17

1

- 21 -

biert. Nach Zugabe von 0,2 ml einer 1%igen wäßrigen
5 FR-ITR-Salz-Lösung läßt man die Mischung 5 min bei
25°C reagieren. Die Reaktionsmischung vermischt man
dann mit 2,0 ml 50%iger Essigsäure und bestimmt die
Absorption bei 475 nm. Die Ergebnisse sind in Fig.5
10 dargestellt, wobei auf der Ordinate die Absorption
und auf der Abszisse die Menge an Plasmin aufgetra-
gen sind.

B e i s p i e l 7

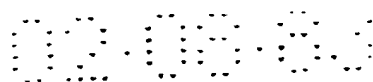
Verfahren zur Bestimmung des Faktors Xa unter Ver-
15 wendung von Bz-Ile-Glu-Gly-Arg- α -NE:

Zu 1,7 ml eines 50 mM Natriumphosphatpuffers (pH 7,0)
gibt man 0,1 ml einer Lösung des Faktors Xa (0,05,
0,1, 0,15 oder 0,2 E/ml) in physiologischer Koch-
20 salzlösung und 0,2 ml einer 10%igen wäßrigen DMSO-
Lösung, die 1 mM Bz-Ile-Glu-Gly-Arg- α -NE enthält.
Jede Mischung wird 15 min bei 20°C inkubiert. Nach
Zugabe von 0,2 ml einer 1%igen wäßrigen FR-ITR-Salz-
Lösung läßt man die Mischung 5 min bei 20°C reagie-
25 ren. Die Reaktionsmischung vermischt man dann mit
2,0 ml 50%iger Essigsäure und bestimmt die Absorp-
tion bei 475 nm. Die Ergebnisse sind in Fig. 6 dar-
gestellt, wobei auf der Ordinate die Absorption und
auf der Abszisse die Menge an Faktor Xa aufgetragen
30 sind.

B e i s p i e l 8

Verfahren zur Bestimmung von C1 \bar{r} unter Verwendung
von Ac-Gly-Lys- α -NE:

35



3327873

M/24 172

18

1

. 22 .

Zu 1,7 ml eines 50 mM Natriumphosphatpuffers (pH 7,0)
5 gibt man 0,1 ml einer Lösung von $C1\bar{F}$ (2,5, 5, 7,5
oder 10 $\mu\text{g/ml}$) in physiologischer Kochsalzlösung und
0,2 ml einer 1 mM wäßrigen Ac-Gly-Lys- α -NE-Lösung.
Die Mischung wird 15 min bei 25°C inkubiert. Nach
Zugabe von 0,2 ml einer 1%igen wäßrigen FR-ITR-Salz-
10 Lösung läßt man die Mischung 5 min bei 25°C reagie-
ren. Die Reaktionsmischung vermischt man dann mit
2,0 ml 50%iger Essigsäure und bestimmt die Absorp-
tion bei 475 nm. Die Ergebnisse sind in Fig. 7 dar-
gestellt, wobei auf der Ordinate die Absorption und
15 auf der Abszisse die Menge an $C1\bar{F}$ aufgetragen sind.

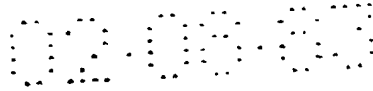
B e i s p i e l 9

Verfahren zur Bestimmung von $C1\bar{S}$ unter Verwendung
von Ac-Tyr- α -NE:

20

Zu 1,7 ml eines 50 mM Natriumphosphatpuffers (pH 7,0)
gibt man 0,1 ml einer Lösung von $C1\bar{S}$ (2,5, 5, 7,5
oder 10 $\mu\text{g/ml}$) in physiologischer Kochsalzlösung
und 0,2 ml einer 10%igen wäßrigen DMSO-Lösung, die
25 1 mM Ac-Tyr- α -NE enthält. Die Mischung wird 15 min
bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml einer
1%igen wäßrigen FR-ITR-Salz-Lösung läßt man die
Mischung 5 min bei 25°C reagieren. Die Reaktions-
mischung vermischt man dann mit 2,0 ml 50%iger
30 Essigsäure und bestimmt die Absorption bei 475 nm.
Die Ergebnisse sind in Fig. 8 dargestellt, wobei
auf der Ordinate die Absorption und auf der Abszisse
die Menge an $C1\bar{S}$ aufgetragen sind.

35



3327873

M/24 172

18

1

. 23.

Beispiel 10

- 5 Verfahren zur Bestimmung von Chymotrypsin unter
Verwendung von Ac-Tyr- α -NE:

10 Zu 1,7 ml eines 50 mM Natriumphosphatpuffers (pH 7,0)
gibt man 0,1 ml einer Lösung von Chymotrypsin (0,2,
0,4, 0,6 oder 0,8 μ g/ml) in physiologischer Koch-
salzlösung und 0,2 ml einer 10%igen wäßrigen DMSO-
Lösung, die 1 mM Ac-Tyr- α -NE enthält. Die Mischung
wird 15 min bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von
15 0,2 ml einer 1%igen wäßrigen FR-ITR-Salz-Lösung läßt
man die Mischung 5 min bei 25°C reagieren. Die Reak-
tionsmischung wird dann mit 2,0 ml 50%iger Essigsäure
vermischt und man bestimmt die Absorption bei 475 nm.
Die Ergebnisse sind in Fig. 9 dargestellt, wobei auf
der Ordinate die Absorption und auf der Abszisse
20 die Menge an Chymotrypsin aufgetragen sind.

Beispiel 11

Verfahren zur Bestimmung von Thrombin unter Ver-
wendung von Bz-Leu-Ala-Arg- α -NE:

25

Zu 1,7 ml eines 50 mM Natriumphosphatpuffers (pH 7,0)
gibt man 0,1 ml einer Lösung von Thrombin (0,25, 0,5,
0,75 oder 1,0 NIH-E/ml) in physiologischer Kochsalz-
lösung und 0,2 ml einer 1 mM wäßrigen Bz-Leu-Ala-
30 Arg- α -NE-Lösung. Die Mischung wird 15 min bei 25°C
inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml einer 1%igen
wäßrigen Fr-ITR-Salz-Lösung läßt man die Mischung
5 min bei 25°C reagieren. Die Reaktionsmischung ver-
mischt man dann mit 2,0 ml 50%iger Essigsäure und

35

M/24 172

28

1

. 24 .

bestimmt die Absorption bei 475 nm. Die Ergebnisse
sind in Fig. 10 dargestellt, wobei auf der Ordinate
die Absorption und auf der Abszisse die Thrombin-
menge aufgetragen sind.

B e i s p i e l 12

Verfahren zur Bestimmung von Trypsin unter Verwen-
dung von Tos-Lys(Me)- β -NE:

Zu 1,7 ml eines 50 mM Tris-HCl-Puffers (pH 7,0) gibt
man 0,1 ml einer Lösung von Trypsin (0,25, 0,5, 0,75
oder 1,0 μ g/ml) in physiologischer Kochsalzlösung
und 0,2 ml einer 1 mM wäßrigen Tos-Lys(Me)- β -NE-
Lösung. Die Mischung wird 15 min bei 25°C inkubiert.
Nach Zugabe von 0,2 ml einer 1%igen wäßrigen FR-ITR-
Salz-Lösung läßt man die Mischung 5 min bei 25°C
reagieren. Die Reaktionsmischung vermischt man dann
mit 2,0 ml Eisessig und bestimmt die Absorption bei
495 nm. Die Ergebnisse sind in Fig. 11 dargestellt,
wobei auf der Ordinate die Absorption und auf der
Abszisse die Trypsinmenge aufgetragen sind.

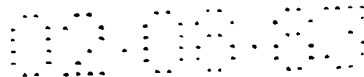
25

B e i s p i e l 13

Verfahren zur Bestimmung von Urokinase unter Ver-
wendung von Ac-Gly-Lys-6-Br- β -NE:

Zu 1,7 ml eines 50 mM Natriumphosphatpuffers (pH 7,0)
gibt man 0,1 ml einer Lösung von Urokinase (300,
600, 900 oder 1200 IE/ml) in physiologischer Koch-
salzlösung und 0,2 ml einer 1 mM wäßrigen Ac-Gly-
Lys-6-Br- β -NE-Lösung. Die Mischung wird 15 min bei

35



3327870

M/24 172

21

1

- 25 -

25°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml einer 1%igen
5 FR-ITR-Salz-Lösung läßt man die Mischung 5 min bei
25°C reagieren. Die Reaktionsmischung vermischt man
dann mit 2,0 ml Eisessig und bestimmt die Absorption
bei 500nm. Die Ergebnisse sind in Fig. 12 dargestellt,
wobei auf der Ordinate die Absorption und auf der
10 Abszisse die Urokinasemenge aufgetragen sind.

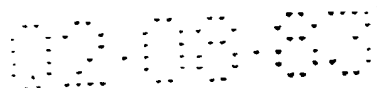
B e i s p i e l 14

Verfahren zur Bestimmung von Antithrombin III unter
Verwendung von Tos-Lys- α -NE:

15

Zu 1,0 ml eines 50 mM Natriumphosphatpuffers (pH 7,4)
mit einem Gehalt an 1 IE/ml Heparin gibt man 1,5 μ l
eines Plasmas, das Antithrombin III in einer Konzen-
tration von 0, 25, 50, 75, 100 oder 125% der Konzen-
20 tration normalen Plasmas enthält, und 0,1 ml
einer Lösung von Thrombin (1,5 NIH-E/ml) in physio-
logischer Kochsalzlösung. Zu der 10 min bei 37°C
inkubierten Mischung gibt man dann 0,1 ml einer
2 mM wäßrigen Tos-Lys- α -NE-Lösung. Die erhaltene
25 Mischung wird erneut 10 min bei 37°C inkubiert. Nach
Zugabe von 0,1 ml einer 1%igen FR-ITR-Salz-Lösung
in 50%iger Essigsäure läßt man die Mischung 5 min
bei 37°C reagieren. Die Reaktionsmischung vermischt
man dann mit 1,0 ml 50%iger Essigsäure und bestimmt
30 die Absorption bei 475 nm. Die Ergebnisse sind in
Fig. 13 dargestellt, wobei auf der Ordinate die Ab-
sorption und auf der Abszisse die Menge an Anti-
thrombin III aufgetragen sind.

35



3327873

M/24 172

22

1

. 26.

Beispiel 15

- 5 Verfahren zur Bestimmung von Antithrombin III mittels
eines Autoanalyzers unter Verwendung von Tos-Lys- α -NE:

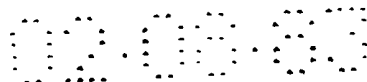
Zu 20 μ l eines Plasmas, das Antithrombin III in einer
Konzentration von 0, 25, 50, 75, 100 oder 125% der
10 Konzentration in normalem Plasma enthält, gibt man
1,0 ml eines 50 mM Natriumphosphatpuffers (pH 7,4),
der Thrombin (4 E/ml), Heparin (5 E/ml) und Rinder-
serumalbumin (1 mg/ml) enthält. Die 2 min bei 37°C
15 inkubierte Mischung wird dann mit 0,1 ml einer 2 mM
wäßrigen, 1% FR-ITR-Salz enthaltenden Tos-Lys- α -NE-
Lösung vermischt und 30 sec bei 37°C inkubiert. Die
Reaktionsmischung vermischt man dann mit 1,0 ml
50%iger Essigsäure und bestimmt nach 1 min die Ab-
sorption bei 540 nm. Als Autoanalyzer wird "Cobas-Bio"
20 (Kabi Co.) verwendet. Die Ergebnisse sind in Fig. 14
dargestellt, wobei auf der Ordinate die Absorption
und auf der Abszisse die Menge an Antithrombin III
aufgetragen sind.

25 Beispiel 16

Verfahren zur Bestimmung von Plasma-Prekallikrein
unter Verwendung von H-Pro-Phe-Arg- α -NE:

Zu 2,0 ml eines 50 mM Natriumphosphatpuffers (pH 6,0)
30 gibt man mit Citrat versetztes Plasma (5, 10 oder
15 μ l) und 10 μ l einer wäßrigen Dextransulfatlösung
(Molekulargewicht 500 000) (30 μ g/ml). Die 5 min
bei 37°C inkubierte Mischung wird mit 0,2 ml einer
2 mM wäßrigen H-Pro-Phe-Arg- α -NE-Lösung, die 0,1%

35



3327873

M/24 172

23

1

.27.

SDS enthält, vermischt und 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml 50%iger Essigsäure, die 1% FR-ITR-Salz enthält, läßt man die Mischung 5 min bei 37°C reagieren. Die Reaktionsmischung vermischt man dann mit 2,0 ml 50%iger Essigsäure und bestimmt die Absorption bei 475 nm. Die Ergebnisse sind in Fig. 15 dargestellt, wobei auf der Ordinate die Absorption und auf der Abszisse die Plasmenge aufgetragen sind.

Beispiel 17

Verfahren zur Bestimmung von Thrombin unter Verwendung von Tos-Lys- α -NE:

Zu 1,7 ml eines 50 mM Natriumphosphatpuffers (pH 8,0) gibt man 0,1 ml einer Lösung von Thrombin (0,5, 1 oder 1,5 NIH-E/ml) in physiologischer Kochsalzlösung und 0,2 ml einer 1,5 mM wäßrigen Tos-Lys- α -NE-Lösung. Die Mischung wird 10 min bei 37°C inkubiert, dann vermischt man sie mit 0,2 ml einer 1%igen FR-ITR-Salz-Lösung in 50%iger Essigsäure und läßt sie 5 min bei 37°C reagieren. Nach Zugabe von 2,0 ml 50%iger Essigsäure bestimmt man die Absorption der Reaktionsmischung bei 475 nm. Die Ergebnisse sind in Fig. 16 dargestellt, wobei auf der Ordinate die Absorption und auf der Abszisse die Menge an Thrombin aufgetragen sind.

M/24 172

24

28

1

Beispiel 18

- 5 Elektrophoretische Bestimmung der Enzymverteilung
im Blut:

Man stellt eine Polyacrylamid-Gelsäule unter Verwendung
eines 7 cm langen Glasrohrs mit einem inneren Durch-
messer von 4 mm her. Die Säule wird mit 40 µl eines
Serums beladen und 50 min der Elektrophorese bei 2 mA
unterzogen. Das Gel wird aus dem Rohr herausgenommen,
in 10 ml einer Lösung von 0,5 mM Tos-Lys- α -NE in
einem 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) getaucht
und 30 min bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml einer
1%igen wäßrigen FR-ITR-Salz-Lösung läßt man das Gel
zur Erzielung einer Färbung 10 min bei 25°C stehen.
Auf diese Weise ist es möglich, die Enzymverteilung
im Blut in Form von orangeroten Banden sichtbar zu
machen. Die Ergebnisse sind in Fig. 17 am Beispiel
von normalem, menschlichem Serum dargestellt.

Beispiel 19

Verfahren zum Färben von Blutzellen:

25

Man stellt einen Blutaussstrich her und fixiert ihn
mit Formalindämpfen. Nach dem Waschen mit Wasser wird
die Probe in 10 ml eines 100 mM Natriumphosphatpuffers
(pH 7,0), der 0,2 mM eines Substrats (Ac-Tyr- α -NE,
Tos-Lys- α -NE oder Ac-Gly-Lys- α -NE) und 0,1% FR-ITR-
Salz enthält, getaucht und 90 min bei 25°C inkubiert.
Die Probe wird mit Wasser gewaschen und unter einem
Mikroskop betrachtet. Die Ergebnisse der Färbung
sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

35

02.08.83

3327873

M/24 172

25

. 29 .

1

Tabelle 2

	Ac-Tyr- α -NE	Tos-Lys- α -NE	Ac-Gly-Lys- α -NE
Lymphocyten	-	-	-
Monocyten	$\pm \sim +$	$\pm \sim +$	+
Granulocyten			
Neutrophile	+++	+++	+++
Eosinophile	-	-	-
Basophile	+	+	+

Beurteilung: - keine Färbung;

 \pm bis +++ Intensität der Färbung.20 B e i s p i e l 20

Die Sensitivitäten gegenüber verschiedenen Enzymen, bestimmt gemäß den in den Beispielen 1 bis 17 beschriebenen Verfahren, sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

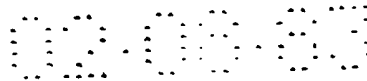
25

30

35

Tabelle 3

Substrat	Enzym	Sensitivität	Einheit
H-pyroGlu-Gly-Arg- α -NE	Thrombin	0.197	$\Delta O, D/NIH-U/min$
H-Leu-Gly-Arg- α -NE	Thrombin	0.261	$\Delta O, D/NIH-U/min$
H-D-Val-Leu-Arg- α -NE	Kallikrein	1.387	$\Delta O, D/KU/min$
Bz-Phe-Val-Arg- α -NE	Thrombin	0.053	$\Delta O, D/NIH-U/min$
Tos-Gly-Pro-Arg- α -NE	Kallikrein	1.747	$\Delta O, D/KU/min$
H-Phe-Val-Arg- α -NE	Thrombin	0.173	$\Delta O, D/NIH-U/min$
Glt-Gly-Arg- α -NE	Thrombin	0.115	$\Delta O, D/NIH-U/min$
H-Gly-Gly-Arg- α -NE	Thrombin	0.377	$\Delta O, D/NIH-U/min$
H-Phe-Arg- α -NE	Kallikrein	1.420	$\Delta O, D/KU/min$
Tos-Gly-Pro-Lys- α -NE	Urokinase	3.55×10^{-4}	$\Delta O, D/IU/min$
Ac-Met- α -NE	Kallikrein	0.0347	$\Delta O, D/KU/min$



3327873

M/24 172

27 . 31.

1

B e i s p i e l 21

- 5 Verfahren zur Bestimmung von Plasminogen unter
Verwendung von Tos-Lys- α -NE:

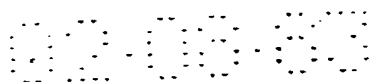
Zu 1,0 ml einer Humanplasma-Lösung (3, 2,5, 2, 1,5,
1 oder 0,5 μ l Plasma/50 mM Natriumphosphat-Puffer)
10 gibt man 0,1 ml einer wäßrigen Lösung von Strepto-
kinase (1000 E/ml). Die Mischung wird 10 min bei
37°C inkubiert, dann mit 0,1 ml einer 2 mM Tos-Lys-
 α -NE-Lösung vermischt und erneut 10 min bei 37°C
inkubiert. Zu der Mischung gibt man 0,1 ml einer
15 1%igen FR-ITR-Salz-Lösung in 50%iger Essigsäure. Man
läßt die Mischung 10 min bei 37°C reagieren. Nach
Zugabe von 1,0 ml Eisessig wird die Absorption der
Reaktionsmischung bei 475 nm bestimmt. Die Ergeb-
nisse sind in Fig. 18 dargestellt, wobei auf der
20 Ordinate die Absorption und auf der Abszisse die
Plasamenge aufgetragen sind.

B e i s p i e l 22

- Verfahren zur Bestimmung von Antiplasmin unter Ver-
25 wendung von Tos-Lys- α -NE:

Zu 1,0 ml einer Humanplasma-Lösung [15, 12,5, 10,
7,5, 5 oder 2,5 μ l Plasma/50 mM Natriumphosphatpuffer
(pH 7,4)] gibt man 0,1 ml einer wäßrigen Lösung von
30 Plasmin (0,1 CI/ml). Die Mischung wird 20 sec bei
37°C inkubiert, dann mit 0,1 ml einer 2 mM Tos-Lys-
 α -NE-Lösung vermischt und erneut 10 min bei 37°C
inkubiert. Zu der Mischung gibt man 0,1 ml einer
1%igen FR-ITR-Salz-Lösung in 50%iger Essigsäure. Man

35



3327873

M/24 172

28

1

.32.

läßt die Mischung 10 min bei 37°C reagieren. Nach
5 Zugabe von 1,0 ml Eisessig wird die Absorption der
Reaktionsmischung bei 475 nm bestimmt. Die Ergeb-
nisse sind in Fig. 19 gezeigt, wobei auf der Ordinate
die Absorption und auf der Abszisse die Plasmamenge
aufgetragen sind.

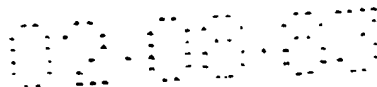
10

B e i s p i e l 23

Verfahren zur Bestimmung von Heparin unter Verwen-
dung von Tos-Lys- α -NE:

15 Zu 0,05 ml einer wäßrigen, 0,01, 0,02, 0,03 oder
0,04 IE/ml Heparin enthaltenden Lösung gibt man
0,05 ml Standardplasma, das mit physiologischer Koch-
salzlösung 10fach verdünnt ist, 1,0 ml eines 50 mM
Natriumphosphatpuffers und 0,1 ml einer wäßrigen
20 Lösung von Thrombin (1,5 NIH-E/ml). Zu der 10 min
bei 37°C inkubierten Mischung gibt man 0,1 ml einer
2 mM Tos-Lys- α -NE-Lösung. Die erhaltene Mischung in-
kubiert man erneut 10 min bei 37°C. Nach Zugabe von
0,1 ml einer 1%igen FR-ITR-Salz-Lösung in 50%iger
25 Essigsäure läßt man die Mischung 10 min bei 37°C
reagieren, vermischt mit 1,0 ml Eisessig und be-
stimmt die Absorption bei 475 nm. Die Ergebnisse sind
in Fig. 20 dargestellt, wobei auf der Ordinate die
Absorption und auf der Abszisse die Heparinmenge
30 aufgetragen sind.

35



3327873

M/24 172

29

. 33 .

1

Beispiel 24

- 5 Verfahren zur Bestimmung von Antithrombin III unter Verwendung von Tos-Lys- α -NE:

10 Zu 0, 5, 10, 15, 20 oder 25 μ l eines Plasmas gibt man 3,0 ml eines 50 mM Natriumphosphatpuffers (pH 7,4),
10 der 0,8 NIH-E/ml Thrombin, 4 IE/ml Heparin und 10 KIE/ml Aprotinin enthält. 50 μ l dieser Mischung gibt man in ein Teströhrchen und inkubiert 10 min bei 37°C. Zu der Mischung gibt man dann 0,1 ml einer 2 mM Tos-Lys- α -NE-Lösung. Die erhaltene Mischung
15 wird erneut 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,1 ml einer 1%igen FR-ITR-Salz-Lösung in 10%iger Essigsäure läßt man die Mischung 10 min bei 37°C reagieren, vermischt dann mit 2,0 ml 30%iger Essigsäure und bestimmt die Absorption bei 475 nm.
20 Die Ergebnisse sind in Fig. 21 dargestellt, wobei auf der Ordinate die Absorption und auf der Abszisse die Plasmamenge aufgetragen sind.

Beispiel 25

- 25 Verfahren zur Bestimmung von Prothrombin unter Verwendung von Tos-Lys- α -NE:

30 Zu 1,0 ml einer Humanplasmalösung (2,0, 1,6, 1,2, 0,8 oder 0,4 μ l Plasma/50 mM Natriumphosphatpuffer) gibt man 0,1 ml einer Lösung eines Schlangengifts (Echis carinatus Gift; 10 μ g/ml) in obigem Puffer. Die erhaltene Mischung wird 5 min bei 37°C inkubiert, anschließend mit 0,1 ml einer 2 mM Tos-Lys- α -NE-Lösung vermischt und erneut 30 min bei 25°C

35

M/24 172.

30

34.

1

5 inkubiert. Nach Zugabe von 0,1 ml einer 1%igen
FR-ITR-Salz-Lösung in 50%iger Essigsäure läßt man
die Mischung 10 min bei 37°C reagieren. Die Reak-
tionsmischung vermischt man dann mit 1,0 ml Eis-
essig und bestimmt die Absorption bei 475 nm. Die
10 Ergebnisse sind in Fig. 22 dargestellt, wobei auf
der Ordinate die Absorption und auf der Abszisse
die Plasmamenge aufgetragen sind.

Fig. 1 zeigt die Auswirkung von Nitritionen
auf die beobachtete Absorption bei Anwendung des
15 erfindungsgemäßen Verfahrens und bei Anwendung eines
bekannten Verfahrens.

Fig. 2 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung
von Thrombin gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

20 Fig. 3 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung
von Trypsin gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Fig. 4 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung
von Urokinase gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Fig. 5 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung
von Plasmin gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

25 Fig. 6 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung
des Faktors Xa gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

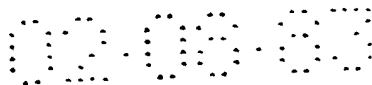
Fig. 7 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung
von C1 \bar{r} gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

30 Fig. 8 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung
von C1 \bar{s} gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Fig. 9 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung
von Chymotrypsin gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Fig. 10 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung
von Thrombin gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

35



3327873

M/24 172

21

1

. 35 .

Fig. 11 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung
5 von Trypsin gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Fig. 12 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung
von Urokinase gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Fig. 13 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung
10 von Antithrombin III gemäß dem erfindungsgemäßen Ver-
fahren.

Fig. 14 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung
von Antithrombin III gemäß dem erfindungsgemäßen Ver-
fahren;

Fig. 15 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung
15 von Plasma-Prekallikrein gemäß dem erfindungsgemäßen
Verfahren.

Fig. 16 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung
von Thrombin gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Fig. 17 zeigt eine Enzymverteilung im Blut,
20 bestimmt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren; das
Zeichen "↑" gibt den Startpunkt an.

Fig. 18 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung
von Plasminogen gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Fig. 19 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung
25 von Antiplasmin gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Fig. 20 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung
von Heparin gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Fig. 21 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung
30 von Antithrombin III gemäß dem erfindungsgemäßen
Verfahren.

Fig. 22 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung
von Prothrombin gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

FIG. 4

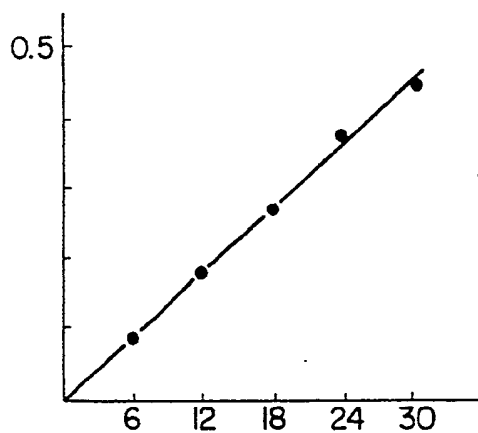


FIG. 5

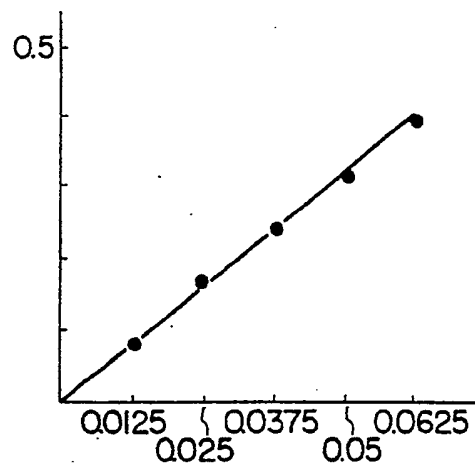


FIG. 6

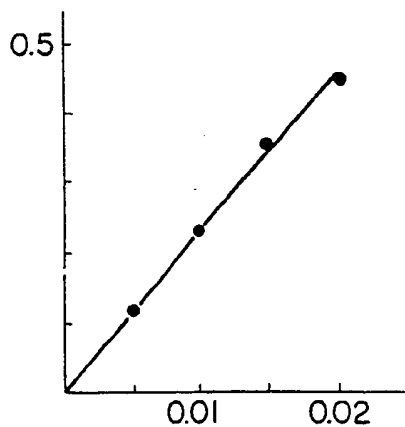
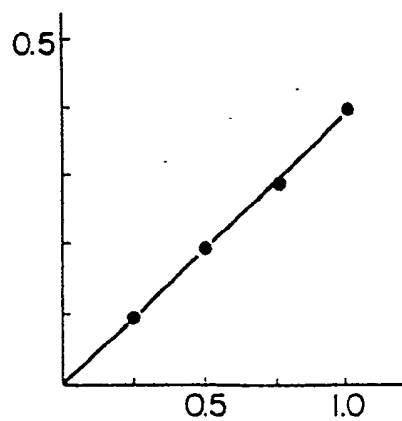


FIG. 7



03-08-83

- 37 -

3327873

FIG. 8

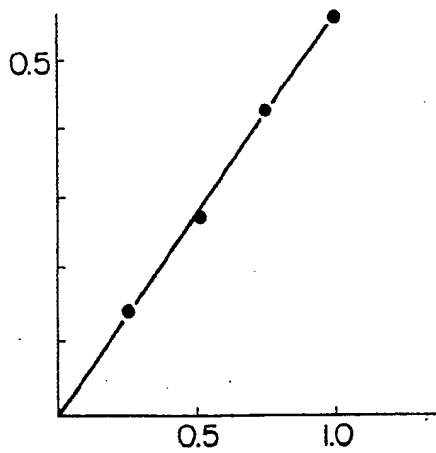


FIG. 9

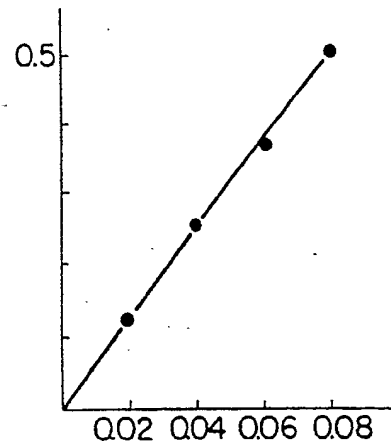


FIG. 10

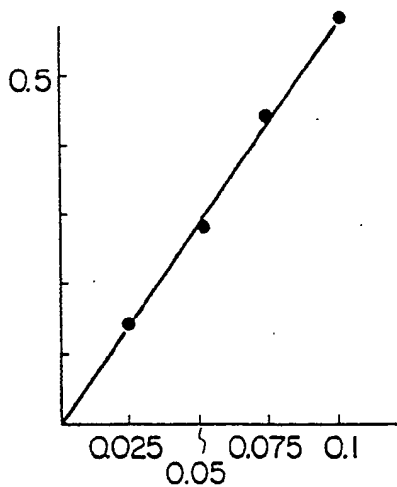


FIG. 11

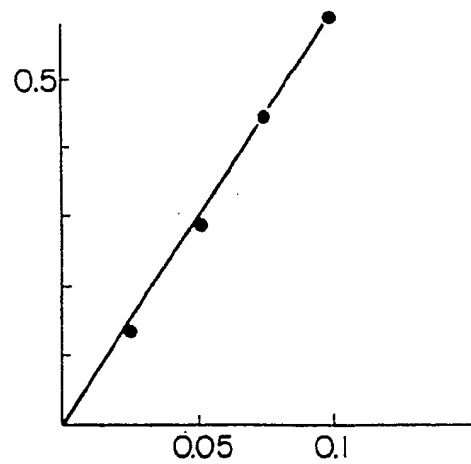


FIG. 12

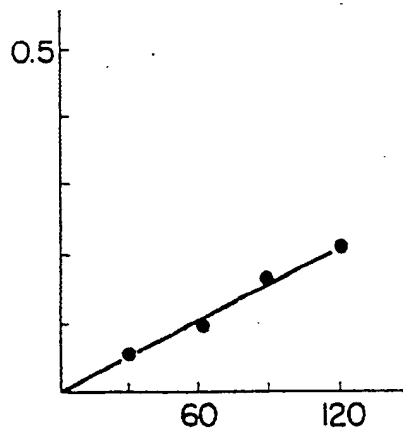


FIG. 13

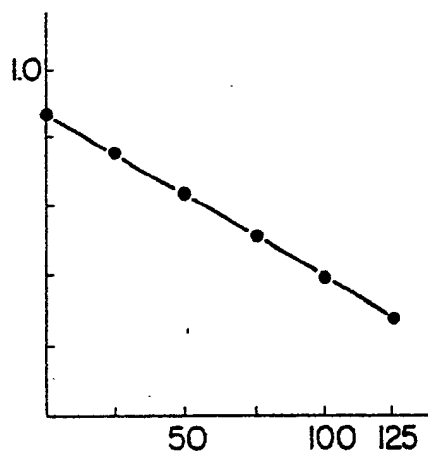


FIG. 14

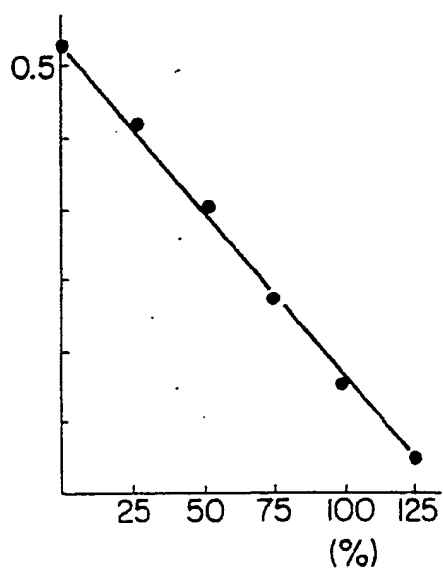
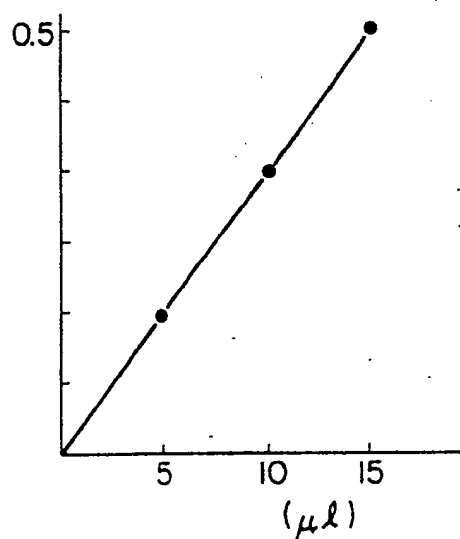


FIG. 15



03-08-83

- 39 -

3327873

FIG. 16

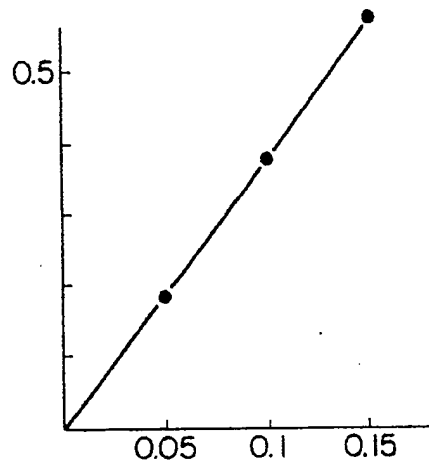


FIG. 17

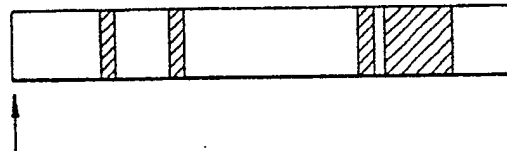


FIG. 18

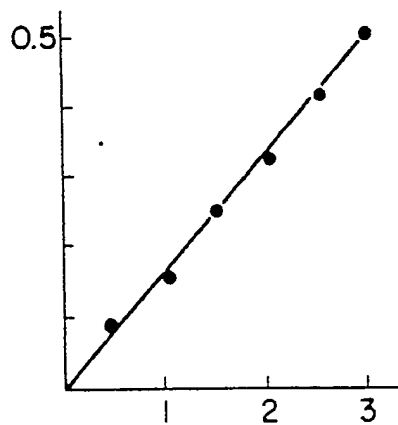


FIG. 19

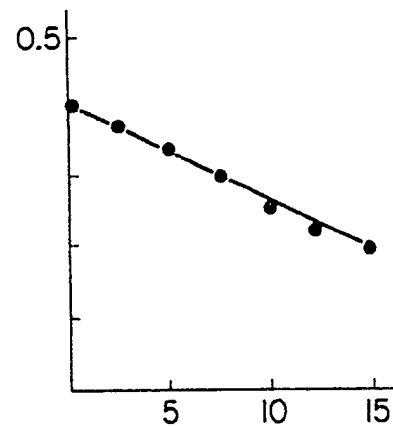


FIG. 20

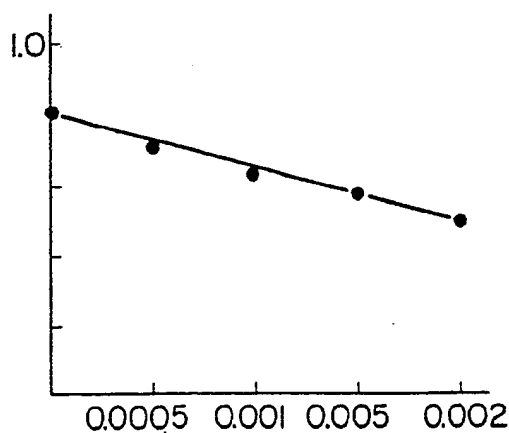


FIG. 21

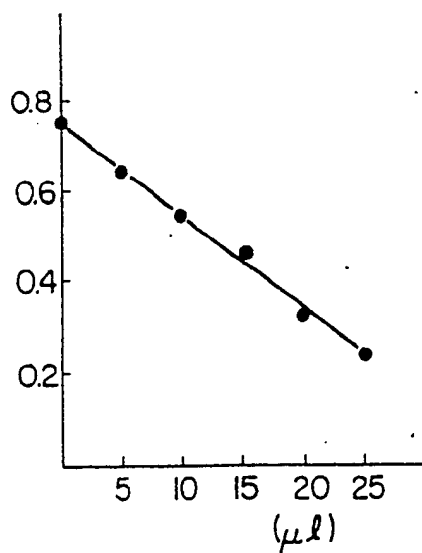
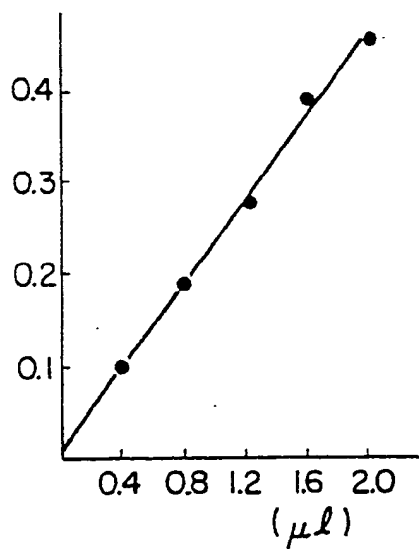


FIG. 22



DE 33 27 873

41-

Nummer: 33 27 873
 Int. Cl.³: C 12 Q 1/34
 Anmeldetag: 2. August 198.
 Offenlegungstag: 9. Februar 198

FIG. 1

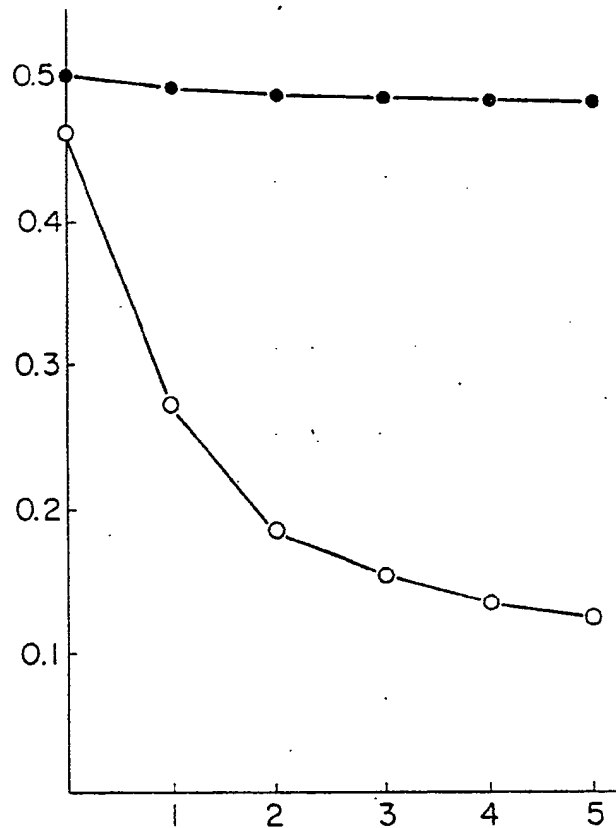


FIG. 2

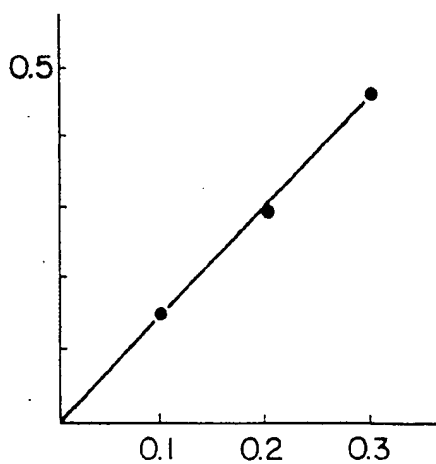


FIG. 3

